

УДК 579.69:581.14+576.353:504.5:[547.77+547.78]

Н. В. ТКАЧУК (УКРАИНА), В. А. ЯНЧЕНКО (УКРАИНА), А. М. ДЕМЧЕНКО (УКРАИНА)

## АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ И ФИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ АНТИПИРИНА С ИМИДАЗОАЗЕПИНОВЫМ ФРАГМЕНТОМ

Исследована антибактериальная активность новых производных антипирина с имидазоазепиновым фрагментом по отношению к коррозионно-опасным сульфатвосстанавливающим и аммонифицирующим бактериям методом диффузии в агар. При этом в концентрациях производных 12÷120 мкг/диск показано развитие бактерий. Более того, отмечена стимуляция роста аммонифицирующих бактерий, что делает соединения неперспективными в качестве биоцидов для защиты металлов от микробной коррозии.

Фитотоксичность производных в концентрации 100 мкг/мл исследована методом биотестирования на *Lepidium sativum* L. и *Allium cepa* L. Определено, что энергия прорастания и всхожесть семян *L. sativum* L. в присутствии исследованных соединений находятся в пределах контроля. Установлено угнетающее действие на рост корней проростков *L. sativum* L. производных с неароматической гетеросистемой без заместителя, с метоксильным радикалом, а также с бромом и хлором в 4-м положении фенильного радикала.

В *Allium*-тесте выявлена высокая цито- и генотоксичность для соединений с неароматической гетеросистемой без радикалов и с метоксильным радикалом, а цитотоксичность – для соединения с метоксильным радикалом, но с ароматической гетеросистемой.

**Ключевые слова:** сульфатвосстанавливающие бактерии; аммонифицирующие бактерии; биотестирование; *Lepidium sativum* L.; *Allium cepa* L.; производные антипирина с имидазоазепиновым фрагментом; митотический индекс; продолжительность фаз митоза; частота хромосомных aberrаций.

Antibacterial activity of new derivatives of antipyrine with an imidazoazepine fragment in relation to corrosive dangerous sulphate-reducing bacteria and ammonifying bacteria has been investigated through the method of diffusion in agar. Thus bacteria development is demonstrated in the concentrations of derivatives 12÷120 µg/disk. Moreover, stimulation of growth of ammonifying bacteria is observed, that turns these connections into unpromising ones as biocides for protecting of metals from microbial corrosion. Phytotoxicity of derivatives in the concentration of 100 µg/ml has been investigated by the method of biotesting on *Lepidium sativum* L. and *Allium cepa* L. It is stated that energy of germination and germination of seeds of *L. sativum* L. in presence of investigated connections are within the control limits. The devastating effect on growth of roots of plantules of *L. sativum* L. derivatives with an unaromatic heterosystem without groups, with methoxy radical as well as with a bromine and chlorine in 4 positions of phenylic radical is stated. High cyto- and genotoxicity is stated within *Allium*-test for connections with unaromatic heterosystem without radicals and with a methoxy radical, while cytotoxicity is observed as connections with a methoxy radical, but with aromatic heterosystem.

**Key words:** sulphate-reducing bacteria; ammonifying bacteria; biotest; *Lepidium sativum* L.; *Allium cepa* L.; derivatives of antipyrine with imidazoazepine fragment; mitotic index; length phases of mitosis; frequency of chromosomal aberrations.

Среди значительного количества новых синтезированных соединений наиболее ценными свойствами обладают производные антипирина с имидазоазепиновым фрагментом, поскольку имеют высокий биологический потенциал. Так, к производным антипирина относятся соединения с широким спектром активности – анальгезирующей, жаропонижающей, противовоспалительной [1]. Кроме того, у производных пиразола и имидазола выявлены гербицидные свойства [2]. Азепины и их производные являются ключевыми структурными фрагментами широкого ряда биологически активных соединений природного и синтетического происхождения и находят широкое применение в медицине и фармакологии [3, 4]. У производных триазолоазепина и триазолоазепиния установлены антибактериальные свойства к агентам микробной коррозии [5, 6]. Однако антибактериальные свойства новых синтезированных производных антипирина с имидазоазепиновым фрагментом по отношению к коррозионно-опасным группам бактерий не изучены.

Производные данного ряда – гетероциклические соединения – являются ксенобиотиками, что обуславливает необходимость оперативной и экономичной системы тестирования их потенциальной опасности. Сегодня большое внимание уделяется исследованиям токсикантов методами биотестирования с использованием различных растений [7]. В частности, для оценки влияния токсикантов давно используется чувствительный тест на прорастание семян и определение разницы в массе и размерах проростков кресс-салата (*Lepidium sativum* L.) [7]. Видом, чувствительным к ксенобиотикам, является также лук репчатый (*Allium cepa* L.). При выполнении этой процедуры измеряют длину корешков проростков лука (ростовой тест), оценивают митотический индекс и хромосомные aberrации в клетках корневой меристемы проростков (*Allium*-тест) [8].

Цель настоящей работы – исследование антибактериальной и фитотоксической активности новых производных антипирина с имидазоазепиновым фрагментом.

### Материалы и методы исследования

Изучали производные антипирина с имидазоазепиновым фрагментом (рис. 1), которые синтезированы на кафедре химии Черниговского национального педагогического университета имени Т. Г. Шевченко. Строение синтезированных соединений определялось на основании данных спектроскопии протонного магнитного резонанса.

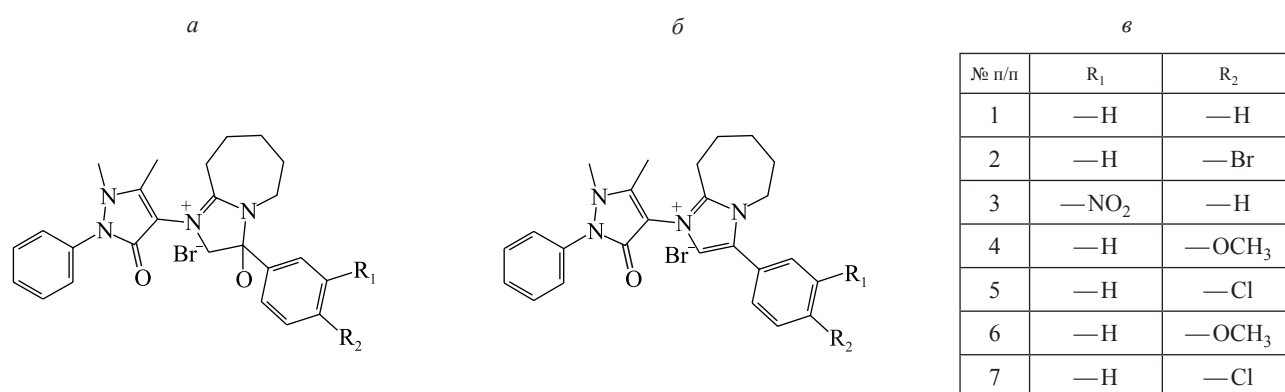


Рис. 1. Формулы производных антипирина с имидазоазепиновым фрагментом:  
*a* – соединения 1–5; *б* – соединения 6, 7; *в* – заместители в структуре синтезированных соединений

Для оценки антибактериальных свойств соединений как тест-культуры использовали 5-суточные накопительные культуры коррозионно-активных бактерий – сульфатвосстанавливающих (СВБ) и аммонифицирующих (АМБ). Образцы получены из грунта ферросферы стальной коррозировавшей трубы после пяти пассажей на средах Постгейта «В» и мясо-пептонном бульоне в условиях периодического культивирования [9]. Титр бактерий составлял  $10^5$  клеток в 1 мл элективных сред.

Чувствительность культур бактерий к производным определяли методом диффузии в агар с использованием стерильных бумажных дисков [10], смоченных 0,2 % (12 мкг/диск), 1,0 % (60 мкг/диск) и 2,0 % (120 мкг/диск) растворами соответствующих соединений в диметилсульфоксиде (ДМСО). Для выращивания СВБ применяли метод Л. Д. Штурм в модификации В. И. Дуды [11].

При установлении фитотоксичности соединений тест-объектами служили кресс-салат (*Lepidium sativum* L.) сорта Ажур и лук репчатый (*Allium cepa* L.) сорта Халцедон. У кресс-салата определяли энергию прорастания, всхожесть семян и биометрические показатели (длина, масса надземной и подземной частей) 5-суточных проростков, рассчитывали фитотоксический эффект производных [7]. Концентрация соединений составляла 100 мкг/мл. Исходные растворы производных готовили в ДМСО из расчета его конечной концентрации в рабочем растворе не более 0,5 %. Схема эксперимента представлена нами ранее [12].

Семена лука проращивали 2 сут в чашках Петри на фильтровальной бумаге в 0,5 % растворе ДМСО. Затем отбирали интактные корешки и обрабатывали их 24 ч при температуре 25 °С соответствующими растворами соединений (100 мкг/мл) в ДМСО (опыт) и 0,5 % растворе ДМСО (контроль). Изготавливали временные давленные препараты по общепринятой методике [13], которые исследовались под микроскопом. В корневой меристеме проростков определяли митотический индекс (МИ, %) и относительную продолжительность фаз митоза (П, М, А, Т, %) согласно [13]. Изучение генотоксичности производных проводили ана-телофазным методом, находили количество клеток с aberrантными хромосомами (Ч, %) [13].

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel 2007. Рассчитывали среднее квадратичное отклонение. В качестве критерия оценки достоверности наблюдаемых изменений использовали *t*-критерий Стьюдента [14]. Статистическую обработку результатов исследования проводили для уровня значимости 0,05.

### Результаты исследований и их обсуждение

Полученные результаты исследования чувствительности сульфатвосстанавливающих и аммонифицирующих бактерий к производным представлены на рис. 2 и 3.

В присутствии производных в концентрациях 12÷120 мкг/диск СВБ и АМБ развивались, на что указывает отсутствие зоны угнетения роста (см. рис. 2 и 3). Кроме того, отмечено положительное влияние соединений на АМБ – есть видимые зоны скопления бактерий вокруг дисков с производными (см. рис. 3). Возможно, это связано с использованием производных в метаболизме аммонифицирующих бактерий.

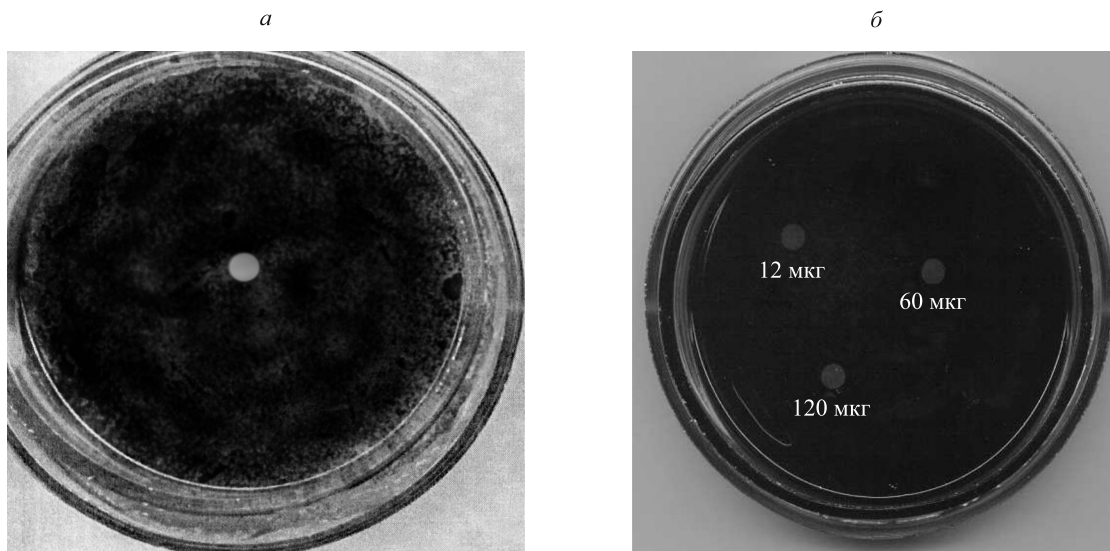


Рис. 2. Чувствительность ассоциативной культуры сульфатвосстанавливающих бактерий: а – к 0,5 % раствору ДМСО (контроль); б – к производным 1–7 (нумерацию см. на рис. 1, в)

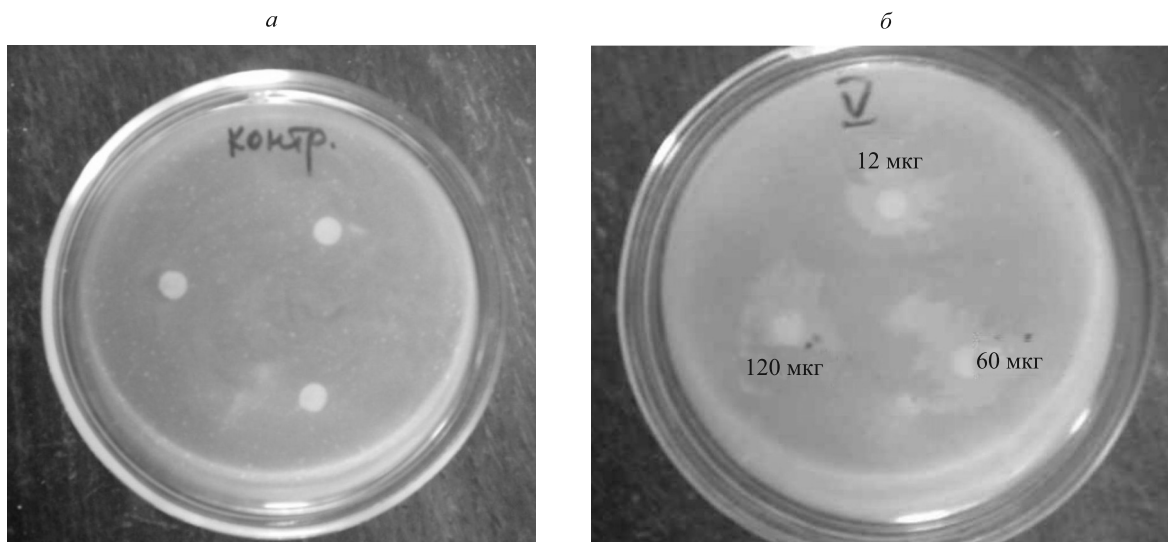


Рис. 3. Чувствительность ассоциативной культуры аммонифицирующих бактерий: а – к 0,5 % раствору ДМСО (контроль); б – к производным 1–7 (нумерацию см. на рис. 1, в)

Результаты исследования фитотоксической активности производных по отношению к *L. sativum* L. представлены в табл. 1.

Таблица 1

**Показатели роста *L. sativum* L. в присутствии производных антипирина  
с имидазоазепиновым фрагментом**

Номер соединения	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %	Длина, см		Масса, мг	
			Надземная часть	Корни	Надземная часть	Корни
Контроль	98,5 ± 0,5	98,5 ± 0,5	4,17 ± 0,09	6,30 ± 0,19	16,0 ± 0,7	2,8 ± 0,9
1	99,5 ± 0,5	99,5 ± 0,5	4,60 ± 0,09*	4,60 ± 0,28*	13,5 ± 3,4	1,5 ± 0,9
2	97,5 ± 1,5	97,5 ± 1,5	4,43 ± 0,09*	5,16 ± 0,25*	18,0 ± 0,8*	2,6 ± 0,1
3	97,5 ± 0,5	97,5 ± 0,5	4,68 ± 0,07*	6,19 ± 0,19	16,8 ± 1,7	1,4 ± 0,1
4	98,5 ± 0,5	98,5 ± 0,5	4,49 ± 0,11*	6,22 ± 0,15	17,7 ± 0,5*	1,9 ± 0,2
5	95,5 ± 1,5	95,5 ± 1,5	4,09 ± 0,09	5,24 ± 0,28*	15,5 ± 3,6	3,7 ± 0,1
6	99,5 ± 0,5	99,5 ± 0,5	4,43 ± 0,11*	5,69 ± 0,23*	20,7 ± 1,0*	4,2 ± 0,2
7	97,5 ± 0,5	97,5 ± 0,5	4,28 ± 0,10	6,78 ± 0,11*	16,4 ± 1,4	1,6 ± 0,3

\*Отличия от контроля достоверны при  $p \leq 0,05$ .

Видно, что энергия прорастания и всхожесть семян в присутствии исследованных производных находятся в пределах контроля.

Соединение 1 (без заместителей в фенильном радикале) обеспечило достоверную тенденцию как стимулирования роста надземной части проростков (в 1,1 раза по сравнению с контролем), так и угнетения роста корней (в 1,4 раза по сравнению с контролем, фитотоксический эффект составил 27,2 %). На массу надземной части и корней соединение 1 не повлияло.

В присутствии соединения 2 (с *para*-бромфенильным фрагментом) также наблюдалась достоверная тенденция к стимулированию роста надземной части проростков – в 1,1 раза по сравнению с контролем. В то же время отмечена достоверная тенденция угнетения роста корней (в 1,2 раза по сравнению с контролем). На массу корней соединение не повлияло, но обеспечило достоверную тенденцию увеличения по сравнению с контролем массы надземной части (в 1,1 раза).

В присутствии соединения 3 (с *meta*-нитрофенильным фрагментом) имела место достоверная тенденция увеличения длины надземной части (в 1,1 раза по сравнению с контролем). При этом соединение не повлияло на рост подземной части, массу стебля и корня.

Соединение 4 (с метоксифенильным фрагментом) обусловило достоверную тенденцию стимулирования роста и увеличения массы надземной части проростков кресс-салата (в 1,1 раза по сравнению с контролем), но не повлияло на длину и массу подземной части.

Подобное изменение биометрических показателей кресс-салата зафиксировано в присутствии соединения 6, которое является аналогом соединения 4 и содержит метоксифенильный тетрагидроимидазоазепиновый фрагмент. Так, длина надземной части проростков больше, чем в контроле, в 1,1 раза. Соединение 6 не повлияло на массу корней, однако обеспечило достоверное угнетение их роста в 1,1 раза по сравнению с контролем (фитотоксический эффект составил 10 %) и стимулирование синтетических процессов в надземной части (в 1,3 раза по сравнению с контролем).

Установлено, что соединение 5 (с *para*-хлорфенильным фрагментом) не повлияло на рост, синтетические процессы в надземной части и корнях (см. табл. 1). В присутствии этого соединения наблюдалась достоверная тенденция угнетения роста корней в 1,2 раза по сравнению с контролем (рис. 2). Фитотоксический эффект при этом составил 17,1 %.

Похожие результаты имели место в присутствии соединения 7, которое является аналогом соединения 5 и содержит *para*-хлорфенильный фрагмент в 3-м положении 3-гидроксигексагидро-3*H*-имидазоазепинового ядра. Так, соединение 7 не повлияло на рост и массу надземной части проростков, а также на массу корней (см. табл. 1). Однако соединение обеспечило достоверную тенденцию стимулирования роста корней – в 1,1 раза по сравнению с контролем.

Результаты исследования фитотоксической активности производных по отношению к *A. cerea* L. представлены в табл. 2.



Цитогенетические показатели клеток корневой меристемы *A. сера* L. под влиянием производных антипирина с имидазоазепиновым фрагментом

Номер соединения	П, %	М, %	А, %	Т, %	МИ, %	Ч, %
Контроль	24,9 ± 3,5	24,0 ± 2,8	28,2 ± 1,5	22,8 ± 2,0	81,4 ± 9,7	0
1	22,2 ± 5,1	16,1 ± 1,7*	31,8 ± 2,0	30,0 ± 4,6	35,5 ± 4,7*	5,6
2	19,1 ± 2,1	31,8 ± 4,2	27,9 ± 0,1	21,3 ± 4,0	72,7 ± 5,9	0
3	13,4 ± 2,5*	25,9 ± 3,4	22,6 ± 2,8	38,1 ± 2,8*	64,1 ± 3,0	0
4	18,1 ± 3,0	26,6 ± 1,2	26,2 ± 2,7	29,2 ± 2,8	16,5 ± 3,2*	3,6
5	32,8 ± 4,4	15,5 ± 3,7	18,4 ± 5,0	33,4 ± 4,3	59,3 ± 4,5	0
6	20,0 ± 1,7	23,4 ± 3,2	26,2 ± 6,5	30,3 ± 2,8	50,4 ± 4,3*	0
7	23,7 ± 3,8	20,5 ± 3,0	27,5 ± 2,4	28,7 ± 1,9	61,7 ± 15,9	0

\*Отличия от контроля достоверны при  $p \leq 0,05$ .

Определено влияние на продолжительность фаз митоза соединений 1 и 3. При этом в присутствии соединения 1 зафиксирована достоверная тенденция снижения по сравнению с контролем относительной продолжительности метафазы (в 1,5 раза), соединения 3 – достоверная тенденция снижения продолжительности профазы (в 1,9 раза) и достоверная тенденция увеличения продолжительности телофазы (в 1,7 раза) (см. табл. 2). Установлено, что соединения 2, 3, 5 и 7 не изменяют митотический индекс, а соединения 1, 4 и 6 достоверно уменьшают его в 2,3, 4,9 и 1,6 раза соответственно. При этом для производного 6 значение МИ совпадает с нормативным показателем для критических условий выращивания тест-растения (50 %), а для производных 1 и 4 ниже его в 1,4 и 3,0 раза соответственно [8]. Клеток с aberrantными хромосомами (Ч, %) в контроле и в опыте с производными 2, 3, 5, 6 и 7 не зафиксировано. В присутствии соединений 1 и 4 частота клеток с aberrantными хромосомами возрастает в 5,6 и 3,6 раза соответственно (см. табл. 2), хотя ее значение и не превышает нормативный показатель для нормальных условий (7,4 %) выращивания тест-растения [8].

Таким образом, антибактериальной активности производных по отношению к коррозионно-опасным сульфатвосстанавливающим и аммонифицирующим бактериям не выявлено, что делает соединения неперспективными в качестве биоцидов для защиты металлов от микробной коррозии. Установлено угнетающее действие на рост корней проростков кресс-салата производных с неароматической гетеросистемой без заместителя, с метоксильным радикалом, а также с бромом и хлором в 4-м положении фенильного радикала. Высокую цито- и генотоксичность проявили соединения с неароматической гетеросистемой без радикалов и с метоксильным радикалом, а цитотоксичность – соединение с метоксильным радикалом, но с ароматической гетеросистемой.

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Крыльский Д. В., Сливкин А. И. Гетероциклические лекарственные вещества (лекарственные вещества с гетероциклической структурой). Воронеж, 2007.
2. Мельников Н. Н. Пестициды. Химия, технология и применение. М., 1987.
3. Bremner J. B., Samoson S. Azepines and their Fused-Ring Derivatives // Comprehensive Heterocyclic Chemistry III. 2008. Vol. 13. P. 1–43.
4. Psychopharmacological Agents / L. O. Randall [et al.]. New York, 1974. Vol. 3. P. 175.
5. Антимикробная активность некоторых производных азепина конденсированного с триазолом и имидазолом / А. П. Третьяк [и др.] // Вісн. Одес. нац. ун-ту. Сер. Біологія. 2001. Т. 6, № 4. С. 313–316.
6. Демченко Н. Р. Зміни популяційного рівня бактерій корозійно активного мікробного угруповання в процесі формування біоплівки на поверхні мало вуглецевої сталі // Annals of Mechnikov's Institute. 2011. № 1. С. 60–63.
7. Багдасарян А. С. Фитотестирование загрязненности почв // Материалы II Всерос. науч.-практ. конф. «Химическое загрязнение среды обитания и проблемы экологической реабилитации нарушенных экосистем» (Пенза, 25–26 марта 2004 г.). Пенза, 2004. С. 18–20.
8. Моніторинг довкілля / В. М. Боголюбов [та ін.] ; під ред. В. М. Боголюбова. Вінниця, 2010.
9. Романенко В. И., Кузнецов С. И. Экология микроорганизмов пресных водоемов. Л., 1974.
10. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках. М., 1969.
11. Бабьева И. П., Зенова Г. М. Биология почв : учеб. для студ. высш. учеб. заведений. М., 1989.

12. Ткачук Н. В., Янченко В. О., Демченко А. М. Фітотоксичність деяких похідних 4-аміно-3,5-диметил-4Н-1,2,4-триазолію // Фіторизноманіття прикордонних територій України, Росії, Білорусі у постчорнобильський період : матеріали Міжнар. наук. конф. (Чернігів, 17–18 грудня 2010 р.). Київ, 2010. С. 237–243.
13. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. М., 1988.
14. Плохинский Н. А. Биометрия. М., 1970.

Поступила в редакцию 16.06.2014.

**Наталія Васильевна Ткачук** – кандидат биологических наук, доцент кафедры биологии и географии химико-биологического факультета Черниговского национального педагогического университета имени Т. Г. Шевченко (Украина).

**Виктор Алексеевич Янченко** – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры химии химико-биологического факультета Черниговского национального педагогического университета имени Т. Г. Шевченко (Украина).

**Анатолій Михайлович Демченко** – доктор фармацевтических наук, профессор кафедры химии химико-биологического факультета Черниговского национального педагогического университета имени Т. Г. Шевченко (Украина).

УДК 612.829.014.42

А. В. СИДОРОВ, А. ЭЛЬРАХАЛ (ЛИВИЯ), Г. Т. МАСЛОВА

### КОРРЕЛЯЦИЯ МЕЖДУ ЛЕГОЧНЫМ ДЫХАНИЕМ И АКТИВНОСТЬЮ СУПЕРОКСИДИДИСМУТАЗЫ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ У МОЛЛЮСКА *LYMNAEA STAGNALIS* ПРИ НАУЧЕНИИ

Представлены результаты, подтверждающие взаимосвязь между системой антиокислительной защиты в клетках нервной ткани и условно-рефлекторной деятельностью. Установлено, что вызываемое при формировании инструментального навыка снижение выраженности легочного дыхания приводит к двукратному возрастанию активности супероксиддисмутазы (СОД) в нервной ткани у опытных моллюсков по сравнению с животными контрольной группы. Выявлено наличие отрицательной корреляции и рассчитаны коэффициенты корреляции ( $r$ ) между активностью СОД и показателями легочного дыхания: частотой ( $r = -0,58 \pm 0,14$ ) и общей длительностью ( $r = -0,52 \pm 0,15$ ) респирации. Предполагается, что состояние антиокислительного баланса в нервной ткани – один из факторов, определяющих реализацию когнитивных процессов в мозге беспозвоночных.

**Ключевые слова:** инструментальный рефлекс; активные формы кислорода; дыхательное поведение; беспозвоночные.

Submitted data confirmed the idea of interaction between neuronal antioxidant defense system and conditioned reflex activity. Operant conditioning that is results in lung respiration decrease also leads to 2-fold rise of superoxide dismutase (SOD) activity in mollusc's CNS in comparison with the animals of control group. Negative correlation between SOD activity and some aspects of pulmonary respiration detected. Correlation coefficients ( $r$ ) for respiratory rate and total amount of aerial respiration were measured as  $-0,58 \pm 0,14$  and  $-0,52 \pm 0,15$  respectively. We estimate that redox balance in nervous tissue is critical for cognitive processes within invertebrate brain.

**Key words:** operant conditioning; reactive oxygen species; respiratory behaviour; invertebrates.

Свободнорадикальная теория старения, связывающая угасание жизненных функций с накоплением в организме активных форм кислорода (АФК), достаточно давно утвердилась в научной среде [1, 2]. Принимая во внимание тот факт, что старение, как правило, ассоциируется с изменением когнитивных функций мозга [3, 4], можно предполагать участие свободных радикалов кислорода в регуляции функциональной активности нейронных ансамблей. Действительно, в последнее десятилетие различными группами исследователей были получены данные, позволяющие рассматривать АФК в качестве агентов межклеточных, в том числе и межнейронных, взаимодействий [5, 6]. Однако вклад свободнорадикальных форм кислорода в становление и поддержание таких процессов, как научение, память, остается не столь понятным прежде всего в силу отсутствия достаточного количества подходящих экспериментальных моделей, позволяющих проводить их исследование на клеточном уровне.

Пресноводный легочный моллюск *Lymnaea stagnalis* (прудовик обыкновенный) – один из классических нейробиологических объектов – обладает довольно подробно охарактеризованной на клеточном уровне центральной нервной системой (ЦНС), особенно в отношении нейронной сети, контролирующей легочное дыхание [7, 8]. Возможность использования данного вида для изучения клеточных механизмов формирования инструментального условного рефлекса была показана в [9, 10]. Вместе с тем данные по биохимическим особенностям мозга прудовика, в том числе и по системе антиокислительной защиты, крайне немногочисленны [11, 12]. Взаимосвязь между изменением дыхательного поведения *Lymnaea stagnalis*, вызванным тренировкой и уровнем антиоксидантной протекции в клетках его ЦНС, никогда прежде не исследовалась. Высказанная гипотеза экспериментально проверялась в настоящей работе.